



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»
(НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ)

мкр. Орлова роща, д. 1, г. Гатчина, Ленинградская область, 188300
Телефон: (81371) 4-60-25, факс: (81371) 3-60-25. E-mail: dir@pnpi.nrcki.ru
ОКПО 02698654, ОГРН 1034701242443, ИНН 4705001850, КПП 470501001

№ 8

«18» мая 2018 г.

УТВЕРЖДАЮ
Заместитель директора по научной работе
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ

Д.Б.Н. С.В. Саранцева

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» на диссертацию **Рабдано Севастьяна Олеговича «Развитие методов ЯМР для исследования состояния биологических молекул в условиях окислительно-восстановительных процессов»**, представленную на соискание степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 – «Физика магнитных явлений».

Актуальность темы выполненной работы

Рецензируемая диссертационная работа Рабдано С.О. посвящена развитию методов ЯМР для изучения биологических систем в состояниях, неподдающихся прямому наблюдению с помощью спектроскопии ядерного магнитного резонанса. В работе рассматриваются три системы, а именно гидратное окружение аминокислот, агрегатные частицы белков и нативно разупорядоченные белки.

Разработка методик ЯМР для получения информации о структуре и динамике в гидратном окружении аминокислот связано с перспективой исчерпывающего описания кинетических процессов, определяющих взаимодействия между биомолекулами. В свою очередь, изучение процесса ЯМР релаксации ядер азота-15 в нативно разупорядоченных белках нацелено на разделение и понимание мод динамики в сложном многообразии конформационных превращений для белковых молекул. И наконец предлагаемая методология ЯМР, основанная на спектроскопии

HSQC и продемонстрированная на протеинопатическом белке TDP-43, для изучения агрегатных частиц может быть применена для получения ценной информации о тельцах включения, являющихся отличительным признаком многих нейродегенеративных заболеваний.

Таким образом, развиваемые в работе новые методы и подходы в ЯМР спектроскопии, релаксометрии и диффузометрии, применяемые к сложным для изучения состояниям биологических молекул, являются актуальными, поскольку позволяют получать информацию, востребованную в биофизике и медицине.

Структура и основное содержание диссертационной работы

Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, списка цитируемой литературы и списка сокращений и условных обозначений. Работа изложена на 138 страницах и включает 35 рисунков и 2 таблицы. Библиографический список содержит 175 наименований. Работа оформлена в полном соответствии с ГОСТ 7.0.12-2011.

Во **введении** описаны актуальность, новизна и практическая ценность диссертации, поставлены цели и задачи, сформулированы основные положения, выносимые на защиту, приводится информация о личном вкладе автора в проделанную работу, о достоверности и апробации результатов на семинарах и конференциях, о публикациях по теме работы, а также о структуре диссертации.

В первой главе рассматривается проблема гидратации органических молекул и ее состояние в современной науке, дано краткое теоретическое описание процесса ЯМР релаксации в быстро обменивающихся системах, описаны детали экспериментов по ЯМР релаксации для изучения гидратации аминокислот, описан новый подход для определения скоростей релаксации дейтронов молекул воды, принадлежащих гидратным оболочкам отдельных функциональных групп молекул растворенного вещества, описаны температурные и концентрационные зависимости для параметров гидратации отдельных функциональных групп органических молекул, обсуждается влияние обмена протонов аммонийных групп на измеряемые скорости ЯМР релаксации ядер растворителя.

Вторая глава посвящена изучению процесса разупорядочивания и агрегации белков вследствие формирования ненативных межмолекулярных дисульфидных связей в условиях окислительного стресса на примере домена RRM2 белка TDP-43. В начале этой главы рассматривается состояние современных исследований в области модификаций белков в условиях окислительного стресса и их последствий для структуры и стабильности, описываются детали масштабных экспериментальных и вычислительных исследований рассматриваемой системы. Затем показано, что при обработке перекисью водорода RRM2 формирует дисульфид-связанные олигомеры. С помощью измерений ЯМР релаксации, включая релаксацию, обусловленную кросс-корреляцией анизотропии химического сдвига и диполь-дипольного взаимодействий, доказываемая, что в спектрах ЯМР наблюдаются сигналы от мономерных цепей белка, а также от гибких хвостов пептидных цепей, входящих в состав агрегатных частиц. Далее предложен эксперимент для измерения степени насыщения дейтерием амидных сайтов в белках, захваченных в агрегатные частицы и не дающих сигналов ЯМР напрямую. С помощью этого эксперимента показано, что RRM2 в агрегатных частицах принимает развернутую конформацию. Следующим пунктом во второй главе идет характеристика агрегатных частиц. Предлагается способ совместной

интерпретации данных о коэффициентах диффузии, измеренных с помощью ЯМР и динамического рассеяния света. Этот подход применяется к системе агрегатных частиц RRM2. Наконец с помощью ЯМР спектроскопии и гель-электрофореза показывается, что RRM2 в окисленных образцах особенно уязвим для протеолитического расщепления. Устанавливается факт обмена между фракцией глобулярного мономерного RRM2 и агрегатными частицами.

В третьей главе рассмотрена динамика нативно разупорядоченных белков (IDP) в аспекте влияния на процесс ЯМР релаксации. Дан краткий обзор литературы по вопросу различных типов движения в IDP, а также по моделированию молекулярной динамики для IDP с различными моделями воды. Описываются детали ЯМР экспериментов и компьютерного моделирования. Далее для скоростей ЯМР релаксации приводятся результаты экспериментов и расчеты из траекторий МД. На основе сравнения данных эксперимента и моделирования при различных температурах обосновывается выбор модели воды для МД. Затем траектории МД анализируются с целью выявить основные формы молекулярного движения, ответственные за ЯМР релаксацию. Предлагается новая методика анализа траекторий МД, позволяющая вычленивать вклады отдельных динамических процессов в ЯМР релаксацию.

Имеются также раздел **«Заключение»**, в котором перечислены основные результаты и сделаны необходимые выводы из этой работы.

Научная новизна полученных результатов

Автор четко сформулировал цель своей работы, которая заключается в разработке методик ЯМР для изучения биологических молекул в состояниях, не позволяющих прямого наблюдения спектроскопией ядерного магнитного резонанса. Методики демонстрируются на примере гидратного окружения аминокислот, агрегатных частицах второго РНК-распознающего домена RRM2 белка TDP-43 и нативно разупорядоченном хвосте гистона H4. Новизна отражена в следующих пунктах:

1. Водное окружение органических молекул рассмотрено в виде системы, в которую входят гидратные оболочки отдельных гидрофильных и гидрофобных молекулярных групп. С помощью предложенного подхода к совместному анализу данных ЯМР и квантово-химических расчетов получены новые данные о координационных числах и временах корреляции вращательного движения, а также их температурные и концентрационные зависимости, для молекул воды вблизи отдельных молекулярных групп органических молекул в водных растворах.

2. Новый вариант ЯМР эксперимента для наблюдения H/D обмена амидных протонов основной цепи белка был применен к системе с агрегатными частицами и позволил показать факт разупорядочивания белковой структуры домена RRM2 белка TDP-43 в составе агрегатов, а также наличие обмена между состояниями глобулярного растворимого белка и агрегатами по механизму, основанному на реакции обмена тиол-дисульфид.

3. Коэффициенты диффузии, определенные с помощью метода ЯМР с импульсным градиентом магнитного поля и метода динамического рассеяния света, впервые были совместно интерпретированы для определения функции распределения частиц по размеру.

4. Для дисульфид-связанного димера была построена структура на основе мономеров домена RRM2 белка TDP-43, и проведено моделирование такого димеров.

5. Траектории МД были проанализированы с помощью нового подхода для нативно разупорядоченных белков совместно с данными по ЯМР релаксации ядер азот-15 основной цепи белка, что позволило изучить по отдельности различные моды молекулярного движения в полипептидной цепи.

Практическая ценность

Подходы к исследованию гидратного окружения аминокислот, разработанные в диссертационной работе, могут быть распространены на другие классы органических соединений. Результаты, относящиеся к дестабилизации белка и формированию агрегатных частиц, позволяют по-новому взглянуть на область рационального дизайна лекарственных препаратов на основе пептидов, связывающихся ковалентно со своей мишенью. В лаборатории биомолекулярного ЯМР СПбГУ проводятся исследования в этом направлении. Анализ спиновой релаксации ядер ^{15}N в нативно разупорядоченном белке показал, что в современной литературе представлено неполное описание мод движения, отвечающих за ЯМР релаксацию. Новые данные, полученные из совместной интерпретации данных ЯМР релаксации и МД, позволили внести ясность в данный вопрос.

Достоверность и апробация работы

Анализ материала диссертации и публикаций автора свидетельствует о том, что соискателем выполнен большой объем экспериментальных исследований в области разработки методик ЯМР, а также компьютерных расчетов методами квантовой химии и молекулярной динамики. Основные результаты работы отражены в 6 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science и Scopus. В 4 из них соискатель является первым автором. Результаты работы были представлены научному сообществу в 18 докладах на международных конференциях. При исследовании систем с биологическими молекулами использовались вспомогательные биофизические методы. Все исследования проводились на современном оборудовании. Сформулированные результаты, выводы и положения, выносимые на защиту, не противоречат опубликованным литературным данным.

Основные достоинства и недостатки по содержанию диссертации

Диссертационная работа Рабдано С.О. выполнена на высоком профессиональном уровне. Автором проведен большой анализ литературных данных и место работы в современной научной картине ясно вытекает из него. Разработанные автором методики и подходы являются фундаментом для основного направления исследований в лаборатории биомолекулярного ЯМР СПбГУ.

К недостаткам по содержанию диссертации можно отнести следующее:

- Диссертация состоит из трех глав, которые посвящены исследованию трех различных систем с биологическими молекулами. По этой причине сложно отследить взаимосвязь между главами, кроме очевидной – развития методологии ядерного магнитного резонанса.
- Предложенная во второй главе изящная процедура коррекции базовой линии в сигнале динамического рассеяния света, не была в нужной мере обоснована. Скорее всего, проблему возникновения плато на базовой линии можно исключить более тщательной пробоподготовкой.

- В первой главе в разделе материалы и методы было бы уместно включить расширенное описание методов квантово-химических расчетов, а не имеющееся краткое, поскольку без дополнительных пояснений сложно оценивать правильность применяемых приближений. Кроме этого, не хватает описания программ и оборудования для компьютерного моделирования.
- Было бы полезным привести физическую интерпретацию полученных из квантово-химических расчетов значений координационных чисел для отдельных молекулярных групп аминокислот.
- Неясно, что означает энергия активации переориентационного движения D_2O в гидратной оболочке CH_2 группы при слабом (и неясно каком) взаимодействии между ними и как эта энергия может быть выше, чем в объемной воде, в которой действуют водородные связи, стр. 31: «энергия активации переориентационного движения была оценена в 20 и 23 кДж/моль для R_{10} и R_{1CH_2} . На основе полученных данных можно сделать вывод, что переориентация молекул воды более затруднена в гидратных оболочках метиленовых групп в сравнении с объемной водой».
- На стр. 46: «Доказательства дисульфидной димеризации RRM2 также были получены с помощью масс-спектрометрии» (стр. 46). Эти доказательства было бы хорошо привести в тексте диссертации, поскольку отсутствие этих результатов порождает вопросы к единственности интерпретации происходящих химических реакций, с участием домена RRM2 белка TDP-43, и его конформационных превращений при добавлении окислительного агента (перекиси водорода).
- В первой главе введена экзотическая единица измерения концентрации растворов – аквамоляльность, используемая лишь в достаточно старой литературе (количество моль растворенного вещества на 55.5 моль растворителя). Такая единица измерения удобна при одновременной работе с растворами на основе H_2O и D_2O , однако в данной работе затрудняет восприятие и не обоснована, поскольку во всех экспериментах используется исключительно тяжелая вода.
- В первой главе в системах не используется буфер, что может в температурных зависимостях приводить к изменению pH. По-видимому, это не будет существенно влиять на получаемые результаты, однако это обстоятельство не прокомментировано в тексте.
- В работе отсутствуют табулированные значения измеряемых скоростей релаксации, о которых можно судить лишь из графиков зависимостей.
- Термин ω -аминокислота плохо применим к α -аминокислоте глицин.
- Для домена RRM2 белка TDP-43 не указана аминокислотная последовательность, что вызывает неудобство при чтении манускрипта.
- Диссертация отличается небрежным представлением материала с описками и ошибками. Так подписи к рисункам на примере рис. 2-10, 2-11, 2-13, 2-14 перегружены обсуждениями, которые лучше вынести в текст. По части описок и ошибок см., например:
 стр. 22: «вода является -й субструктурой растворителя» пропущено i ;
 стр. 31: «Дейтронные» вместо дейтронные;
 стр. 50: «типичного неупорядоченных белков» пропущено для;
 стр. 71: «с уравнением (2)» д.б. с уравнением (2.2);

стр. 72: «уравнения (6)» д.б. уравнения (2.6);
стр. 81: «полученной в для раствора»;
стр. 92: «влияет только на результаты только первых»;
стр. 101: «на Рисунок 3.4, 3.5, 3.6».
стр. 114: в последних двух строках Таблицы 3.1 (столбец 2) указанную единицу измерения $\mu\text{с}$ следует заменить на нс .
и т. д.

Высказанные замечания не являются принципиальными и не снижают общего положительного впечатления от диссертации. А достоверность результатов этой работы, несомненно, подтверждается тем, что они были опубликованы в международных высоко рейтинговых научных журналах и неоднократно представлены на профильных семинарах и конференциях.

В целом диссертационная работа, написанная Рабдано С.О., является завершённым научным исследованием, выполненным на высоком теоретическом и экспериментальном уровне, и производит хорошее впечатление. Публикации по теме диссертационной работы полностью отражают ее содержание. Отмеченные недостатки, на мой взгляд, не умаляют достоинств работы. Результаты работы обладают высокой научной актуальностью, новизной и потенциально имеют значительную практическую значимость. Считаю, что диссертация, представленная Рабдано С.О., удовлетворяет требованиям, предъявляемым к диссертациям (пункты 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением правительства Российской Федерации №842 от 24 сентября 2013г. в редакции от 30.07.2014), а ее автор заслуживает присуждения ученой степени кандидата физико-математических наук по специальности 01.04.11 – «Физика магнитных явлений».

Отзыв на диссертацию обсужден на Ученом совете Отделения молекулярной и радиационной биофизики НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ 18 апреля 2018 г., протокол № 98.

Отзыв подготовил

Ученый секретарь отделения молекулярной и радиационной биофизики
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ,
к.ф.-м.н.

К.А. Шабалин
shabalin_ka@pnpi.nrcki.ru

Руководитель Отделения молекулярной и радиационной биофизики
НИЦ «Курчатовский институт» – ПИЯФ,
к.ф.-м.н.

А.Л. Коневега
konevega_al@pnpi.nrcki.ru

Контакты ведущей организации:

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт».
188300, Ленинградская область, г. Гатчина, мкр. Орлова роща, д. 1.
Тел.: +7 (81371) 460-25, E-mail: dir@pnpi.nrcki.ru.